

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：細胞外小胞を利用したバイオ医薬品の経口デリバリー法の開発

Development of oral delivery method of biopharmaceutics using extracellular vesicles

研究開発実施期間：令和元年 12 月 16 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：高橋有己

Yuki Takahashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Associate professor

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

近年タンパク質や核酸医薬品をはじめとしたバイオ医薬品の開発が盛んに行われている。バイオ医薬品はその用途あるいは使用されるバイオ医薬品の特性や、対象とする疾患の種類や標的臓器・組織に応じて、様々な投与経路で投与される。バイオ医薬品の投与経路の中でも簡便かつ患者に負担の少ない投与経路として期待されるのが経口投与である。しかしながら、バイオ医薬品の経口投与後の吸収効率は低いため、改善手法の開発が望まれる。その吸収効率の改善方法になりえると期待されているのが、細胞由来の膜小胞である細胞外小胞 (Extracellular vesicle; EV) である。これまでに EV に医薬品を搭載することで、経口投与後の吸収効率が上昇しうることが報告されていた。しかしながら、EV の消化管内挙動についてはほとんど解析されておらず、情報は乏しい。また、既存の報告は脂溶性の低分子蛍光物質を利用して標識した EV を用いた結果に留まるため、例えば EV から離脱した脂溶性蛍光色素を見ている可能性も否定はできず、また定量性も低いため、確かなものではないといえる。従って、EV を用いたバイオ医薬品のデリバリー法の開発に際しては EV に搭載されたタンパク質の挙動の解析が望まれる。EV については従来は粒子径により 200~1000nm 程度のマイクロベシクルと 30~200nm 程度のエクソソームとに分類されてきたが、従来想定されていたように単純に分類されるものではなく、さらに多種類の EV が存在する可能性が近年明らかとなってきている。我々がこれまでに実施した研究においても、血中に存在する EV の中には、血中滞留性のように体内動態の異なる複数の EV が存在する可能性を見出しており、例えば同一の細胞の培養上清より、調製条件を選択することで種々の異なる EV が回収可能であることを見出しており、細胞から放出される EV は単一の均質な集団ではなく、粒子径や表面電荷の異なる様々な EV が細胞から放出されていることが明らかとなっている。しかしながら、これらの EV の分画・回収方法については未だ確立しておらず、サイズや表面電荷の異なる EV の回収方法については検討が必要であった。また、このような粒子特性の異なる EV はそれぞれ異なる体内動態特性を示しうると考えられるが、その体内動態情報についてはほとんど調べられておらず、消化管内における挙動に EV の種類の違いが及ぼす影響についても一切情報が存在しない。そこ

で本研究では、各種の EV の回収方法を確立したのち、それらを消化管内に投与した後の吸収について評価した。その後、消化管内における詳細な挙動について検討した。また、消化管内における挙動の改善を目的として、EV に各種のペプチドリガンドを修飾し、その影響についても評価した。以下にその結果を詳述する。

培養細胞の上清からの各種の EV の回収方法の確立に取り組んだ。最初はサイズの異なる EV の回収方法の確立を目的として検討を行った。分画に際しては、我々がこれまでに開発した EV 移行性タンパク質と gLuc との融合タンパク質を利用した EV 標識法を用いて、gLuc 活性の測定により各 EV を検出した。まずは、遠心操作にて段階的に遠心を行い、10000g で沈殿させることで、比較的大きな Large extracellular vesicle (IEV) を、さらに 100000g で沈殿させることで Small extracellular vesicle (sEV) を回収した。また、沈殿しなかった上清の画分をさらに分画することにより、Extremely small extracellular vesicle (esEV) を回収した。回収した各画分を電子顕微鏡により観察したところ、それぞれ、500nm、100nm、30nm 程度の粒子径を持った粒子であることが明らかとなり、サイズに応じた EV の回収法の確立に成功したことを明らかとした。また、それぞれの回収量については、sEV が最も多く回収でき、その次に IEV、esEV の順の回収量であった。

次に、電荷の異なる EV の回収の可能性について検証した。この検討に際しては最も回収量の多かった sEV を対象とした。sEV は一般に負電荷を有していることから、中にはその負電荷が弱い EV もいるのではないかと仮説を立て、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。その結果、負電荷の弱い sEV を、少量ではあるものの回収に成功した。この負電荷の弱い sEV は通常の sEV とは異なる動態特性を有している興味深い sEV ではあったが、回収量が低いために利用が困難であると判断し、移行の検討では検討を行わないこととした。

回収した 3 種のサイズの異なる sEV を経口投与後の動態について、gLuc で標識した各 EV を対象として評価することとした。当初はゾンデによる経口投与を計画していたが、マウスと人との胃内滞留性の違いには留意すべきであり、ヒトでの経口投与に際しては腸溶性剤とすることも可能と判断したことから、胃内での滞留性を気にせず済む十二指腸内への注射投与により投与した。gLuc により標識した各 EV をマウスの十二指腸内へ投与したところ、いずれも血中へ移行した。また、投与部位である小腸に加えて肝臓においても gLuc 活性が検出された。いずれの場合においても、大きな差はないものの、sEV が血中ならびに肝臓への高い移行効率を有していた。

マウス十二指腸内へ、gLuc 標識した各 EV を十二指腸内へ投与後、投与部位である小腸における gLuc 活性を評価したところ、その活性については小腸上部に多く存在していた。これは十二指腸内へ投与に際してはマウスの開腹が必要であり、麻酔を維持していたために消化管内における移動が制限されていたためではないかと考察している。そこで、次に脂溶性蛍光色素である PKH67 を用いて蛍光標識した 3 種の EV を調製し、小腸内における分布を観察することとした。初めに、蛍光標識について確認し、いずれも蛍光標識が可能であることを確認した。また、このときの蛍光標識の効率についても評価したところ、sEV が最も効率よく PKH67 によって蛍光標識可能であった。次に、この蛍光標識した各 EV を十二指腸内へ投与後、臓器を回収し凍結切片を作製し蛍光観察を行った。その結果、いずれの EV を投与した群においても小腸の粘膜固有層とその下の組織における EV の局在が観察された。そこで、関与する細胞を同定するために、血管内皮細胞マーカー CD31 ならびにマクロファージマーカーである F4/80 に対する抗体で、それぞれの凍結切片を免疫蛍光染色し、観察を行ったところ、CD31 との共局在は観察されなかったが、F4/80 との共局在が観察された。また、マクロファージとの共局在は特に sEV において多く観察された。以上の結果より sEV を対象として以降の検討を行った。

以上の検討の結果より対象とすることとした sEV について、消化管内に投与後の動態の制御を目的として機能性ペプチドを搭載した。機能性ペプチドとして細胞膜透過性ペプチドである TAT 及びペネトラチン、腸上皮細胞において高分子薬物の透過性を向上させることが報告されている cyclic DNP、タイトジャンクション開口ペプチドである AT-1002、M 細胞ホーミングペプチドである CKS9 を選択した。sEV をビオチン結合タンパク質であるストレプトアビジンで修飾し、これを選択した各ペプチドのビオチン誘導体と混合することで、sEV へ搭載した。調製した gLuc で標識した各ペプチド搭載 sEV を十二指腸内投与したが、血中への移行効率はほとんど変化

しなかった。次に、PKH67 で蛍光標識した sEV に各ペプチドを搭載し、これらを投与後の小腸の凍結切片を観察したところ、AT-1002 あるいは CKS9 を搭載した sEV の投与によって、小腸組織内の蛍光強度が未修飾 sEV と比較して増大していたことから、これらのペプチドを搭載することで消化管内における sEV 透過性の亢進が可能であることが示唆された。

以上の検討において、消化管内に投与された sEV は消化管内におけるマクロファージへのバイオ医薬品の送達に非常に有用な手法となりえると考えられた。また、当初はインスリンをモデル薬物として想定していたが、マウスを開腹しての十二指腸内投与において、慢性疾患である I 型糖尿病モデルマウスの治療へのインスリン搭載 sEV の複数回の投与は不可能であるとも判断した。以上の経緯より、モデル疾患として炎症性腸疾患であるデキストラン硫酸ナトリウムを用いた潰瘍性大腸炎を選択し、sEV に搭載するバイオ医薬品として、炎症性マクロファージを抗炎症性マクロファージへと誘導可能なサイトカインであるインターロイキン-4 (IL4) を選択した。IL4 を搭載した sEV の調製の確立と、その sEV の抗炎症能については、培養マクロファージを用いた実験系において確認した。また、マウスへの投与に際しては、複数回投与を想定し開腹を伴わない消化管内投与として、カテーテルの肛門からの挿入による大腸内への投与法を確立した。その治療効果についても検証したが、IL4 を搭載した sEV は、炎症応答の抑制傾向を示した。

様々な特性を有する EV について、その回収方法を確立するとともにその体内動態特性を明らかとしたが、これらは広範な EV 研究の分野において重要な知見となりえる。また、消化管内に投与された EV の詳細な挙動を明らかとしたが、EV を利用したバイオ医薬品のデリバリー法の開発において重要な情報である。加えて消化管内に投与された EV がマクロファージをはじめとした免疫細胞へ指向性を有することを明らかとしたが、これは EV を利用したバイオ医薬品による免疫療法の開発の可能性を示す有用な知見と考える。

Biopharmaceuticals have been actively developed. Among the routes of administration, oral administration is expected to be the most convenient route for patients. However, the absorption efficiency of biopharmaceuticals after oral administration is low, so it is desirable to develop a method to improve the absorption efficiency. Extracellular vesicles (EVs), which are cell-derived membrane vesicles, are expected to improve absorption efficiency. However, information on the behavior of EVs in the gastrointestinal tract has been poorly analyzed. On the other hand, it has become clear in recent years that EVs are not simply classified by particle size as previously thought, and that there may be many more types of EVs. However, methods for fractionation and recovery of these EVs have not yet been established, and methods for recovery of EVs with different sizes and surface charges need to be investigated. In addition, there is no information on the effects of different types of EVs on their behavior in the gastrointestinal tract. In this study, we established a method to collect various EVs and evaluated their absorption after administration in the gastrointestinal tract. The detailed behavior of EVs in the gastrointestinal tract was then examined. In order to improve the behavior in the gastrointestinal tract, we also evaluated the effects of modifying the EVs with various peptide ligands. The results are detailed below.

Firstly, we established a method for the recovery of various EVs from the supernatant of cultured cells. The first step was to establish a method for the recovery of EVs of different sizes. Centrifugation was performed in steps to collect relatively large extracellular vesicles (IEV) by precipitation at 10,000g and small extracellular vesicles (sEV) by further precipitation at 100,000g. Extremely small extracellular vesicles (esEV) were recovered by further fractionation. The recovered fractions were observed by electron microscopy and were found to be particles with diameters of 500 nm, 100 nm, and 30 nm, respectively. The highest amount of sEV was recovered, followed by IEV and esEV. Next, the possibility of recovering EVs with different charges was examined. sEV with a weak negative charge was successfully recovered by anion exchange chromatography, albeit in small quantities. Although this weakly negatively charged sEV had interesting kinetic properties that differed from those of normal sEV, it was considered to be difficult to utilize due to the low amount recovered.

We decided to evaluate the kinetics of the three recovered sEVs of different sizes after oral administration for each EV labeled with gLuc. The gLuc-labeled sEVs were administered by injection into the duodenum. As a result, very small portion of the administered EVs migrated into the blood. In addition, very small gLuc activity was detected in the liver.

Next, we prepared three types of EVs fluorescently labeled with PKH67, a fat-soluble fluorescent dye, and observed their distribution in the small intestine. As a result, EVs were localized in the mucosal lamina propria of the small intestine and the underlying tissues. To identify the involved cells, we immunofluorescently stained the frozen sections with antibodies against the vascular endothelial cell marker CD31 and the macrophage marker F4/80, and observed the co-localization with F4/80, but not with CD31. Co-localization with macrophages was observed more frequently, especially in sEV. Based on these results, sEV was targeted for further study.

Functional peptides were added to sEV for the purpose of controlling its kinetics after administration in the gastrointestinal tract. The functional peptides selected were TAT and penetratin, which are membrane-permeable peptides, cyclic DNP, which has been reported to improve the permeability of high-molecular-weight drugs in intestinal epithelial cells, AT-1002, a tight junction opening peptide, and CKS9, an M cell homing peptide. Each peptide-loaded sEV labeled with the prepared gLuc was administered intraduodenally, but the transfer efficiency into the blood was almost unchanged. Next, we loaded each peptide onto PKH67-labeled sEV. It was found that loading of AT-1002 or CKS9 on sEVs increased tissue penetration of the sEVs. These results suggest that the permeability of sEV in the gastrointestinal tract can be enhanced by the modification with these peptides.

In these studies, sEV administered in the gastrointestinal tract was considered to be a very useful method for the delivery of biopharmaceuticals to macrophages in the gastrointestinal tract. Therefore, we selected ulcerative colitis with dextran sulfate sodium, an inflammatory bowel disease, as the model disease, and interleukin-4 (IL4), a cytokine capable of inducing inflammatory macrophages into anti-inflammatory macrophages, as the biopharmaceutical to be loaded on the

sEV. The establishment of the preparation of sEV loaded with IL4 and the anti-inflammatory capacity of the sEV were confirmed in vitro. For administration to mice, we established a method of administering sEV into the colon by insertion of a catheter through the anus as intra-gastrointestinal administration without opening the abdomen, assuming multiple administrations. The therapeutic efficacy of sEVs containing IL4 showed a tendency to suppress inflammatory responses.

We have established recovery methods for EVs with various characteristics and clarified their pharmacokinetic properties, which may be important knowledge in a wide range of EV research fields. In addition, EVs administered into the gastrointestinal tract were found to be directed toward macrophages and other immune cells, which is a useful finding that indicates the possibility of developing immunotherapy using EVs as a biopharmaceutical.